AUS DEM INSTITUT
DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE II
DIREKTOR: PROF. DR. W. STAIB

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON STREPTOZOTOCIN-INDUZIERTEM DIABETES UND BETAMETHASONGABEN AUF DIE PYRUVATOXIDATION DES SKELETTMUSKELS IN RUHE UND UNTER ARBEIT

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

ARTHUR DAHLBÜDDING

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

Untersuchungen zum Einfluß von streptozotocin-induziertem Diabetes und Betamethasongaben auf die Pyruvatoxidation des Skelettmuskels in Ruhe und unter Arbeit

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Arthur Dahlbüdding
1984

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof.Dr. Berger
(Prodekan)

Referent
gez.: Prof.Dr. Staib

Korreferent
gez.: Prof.Dr. Reinauer

Meinen Eltern und meiner Frau Ursula gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung 1

2. Material und Methoden 7

2.1 Vorbehandlung der Versuchstiere 7

2.2 Methodik der Perfusion 8

2.2.1 Perfusionsmedium 8

2.2.2 Perfusionsapparatur 9

2.2.3 Organpräparation 11

2.2.4 Infusion radioaktiver Tracer 12

2.2.5 Verlauf der Perfusion 13

2.3 Messungen 13

2.3.1 Messungen der Gesamt-^{14}C-Aktivität 13

2.3.2 Messung von $^{14}CO_2$ 15

2.4 Grenzen für die Halbwertszeiten der Auswaschkinetiken 16

2.5 Ermittlung der Halbwertszeit 16

2.6 Versuchsplanung 20

3. Ergebnisse 21

3.1 Durchflußgeschwindigkeiten 21

3.2 Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus ^{14}C-Pyruvat 23

3.3 Verlaufskurven der $^{14}CO_2$-Entwicklung aus ^{14}C-Pyruvat bei Tieren unter Arbeit 24

4. Diskussion 27

4.1 Vorteile des Modells des perfundierten Hinterkörpers 27

4.2 Validität der verwendeten Methodik 28

4.2.1 Off-Kinetik 28

4.2.2 Messungen am Plateau 29

4.3 Diskussion der Ergebnisse 31

4.3.1 CO_2-Auswaschkinetiken 31

4.3.2 Messungen von Änderungen der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus ^{14}C-Pyruvat unmittelbar nach Arbeitsbeginn (Plateaumessungen) 34

5. Zusammenfassung 35

6. Literaturverzeichnis 37

7. Danksagung 40

8. Lebenslauf 41

1.

Einleitung

Pyruvat als Endprodukt der aeroben Glykolyse und Zwischenprodukt beim Abbau der Aminosäuren Alanin, Serin und Cystein wird durch die Pyruvatdehydrogenase oxidativ decarboxyliert und als Acetyl-CoA in den Citratcyclus eingeschleust (1). Die Pyruvatdehydrogenase (PDH) ist im Säugetierorganismus ein Multienzymkomplex in der inneren Mitochondrienmembran. Entsprechend seiner Aufgabe ist der PDH-Multienzymkomplex mannigfaltigen Regulationen unterworfen.

Zur oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat durch die PDH werden die Cofaktoren Thiaminpyrophosphat, a-Liponsäure, Coenzym-A, Mg^{2+}, Ca^{2+} und NAD^{+} benötigt. Abb. 2 veranschaulicht den Mechanismus der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat.

Die PDH ist ein interkonvertierbares Enzym (1,14). Sie existiert als aktive Dephospho-PDH (PDHa) und als inaktive Phospho-PDH (PDHb). Die Aktivierung der PDHb katalysiert eine spezifische PDHb-Phosphatase, die Inaktivierung unter ATP-Verbrauch eine spezifische PDHa-Kinase (2) (Abb. 3).

Hemmend auf die PDHa-Kinase wirken Pyruvat, Coenzym-A, NAD^{+}, ADP und Dichloracetat, aktivierend NADH + H^{+}, ATP und Acetyl-CoA (3, 4). Die Bildung der aktiven Form (PDHa) ist in Gegenwart von Insulin, Agmatin und Nicotinsäure begünstigt. Bei Sauerstoffmangel wird die Form der inaktiven PDHb bevorzugt (4).

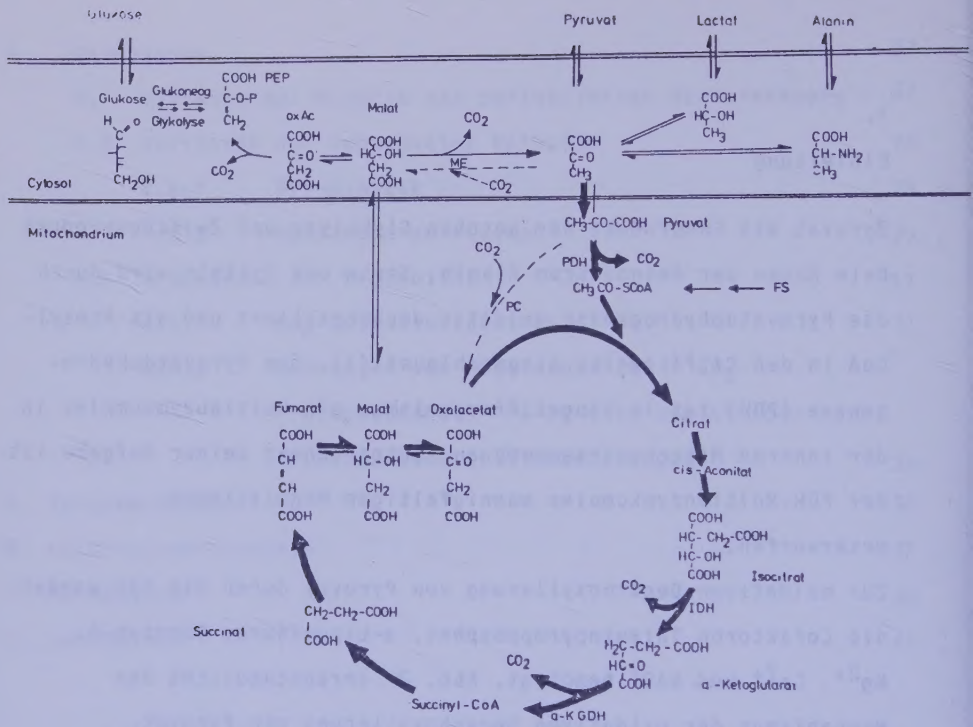

Abb.1
Die Stellung des Pyruvatdehydrogenase-Multiemzymkomplexes (PDH) im Stoffwechsel

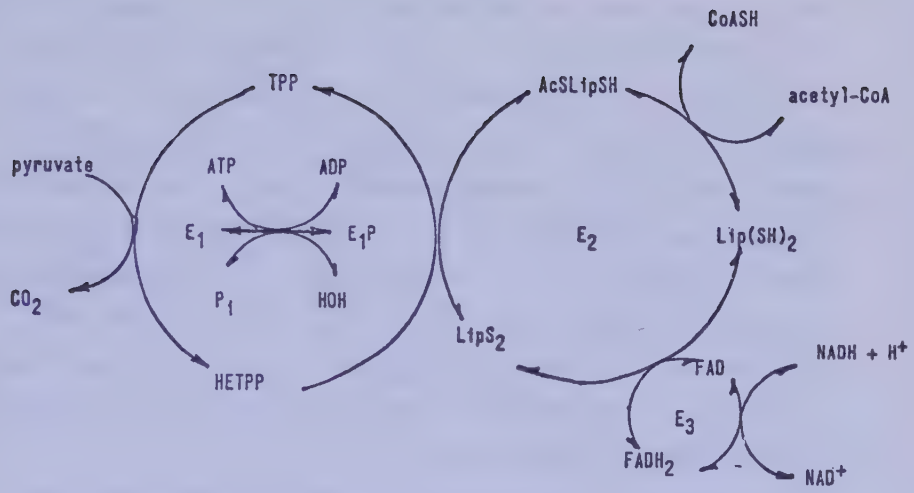

Abb. 2

Schematische Darstellung der Pyruvatoxidation am Pyruvatdehydrogenase Multienzymkomplex

E_1: Pyruvat-Decarboxylase (EC 1.2.4.1)
E_2: Dihydrolipoyl-Transacetylase (EC 2.3.1.12)
E_3: Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (EC 1.6.4.3)

Aktivitätsmessungen der PDH wurden bisher an verschiedenen Geweben vorgenommen (Leber, Herz, Gehirn, Fettgewebe), wobei meist der Prozentsatz der aktiven PDH (PDHa) an der Gesamt-PDH (PDHt) ermittelt wurde (5). Wenig ist jedoch über die Aktivitätsregulierung im Skelettmuskel bekannt. Bisher wurden "in vitro"-Messungen der Enzymaktivität der PDH nach Präparation von Muskelgewebe durchgeführt (5,6). Um Aussagen über stoffwechselrelevante Regulationsvorgänge machen zu können, scheint es vorteilhaft, statt der Aktivitätsänderung der PDH den Substratfluß unmittelbar zu verfolgen. Dazu bietet sich das Modell des isoliert perfundierten Rattenhinterkörpers an.
In vorhergehenden Untersuchungen (7) wurde dieses Modell auf Normaltiere angewendet. Dabei wird dem Perfusionsmedium über einen Zeitraum, der für die Gleichgewichtseinstellung ausreichend bemessen ist, Tracermengen an radioaktivem Pyruvat zugesetzt. Ist das Pyruvat an C1 markiert, wird bei der PDH-katalysierten Reaktion radioaktives CO_2 freigesetzt, das sich wiederum durch Diffusion mit dem Perfusionsmedium ins Gleichgewicht setzt. Aus dem fraktioniert aufgefangenen Perfusat läßt sich in der Folge dann $^{14}CO_2$ austreiben und nach Absorption in einer geeigneten Lösung quantitativ messen.

Da aus "in vitro"-Aktivitätsbestimmungen der PDH ersehen werden kann, daß der aktive Anteil der PDHa bei gefütterten streptozotocin-diabetischen Tieren von 28% auf 23% sinkt (8),

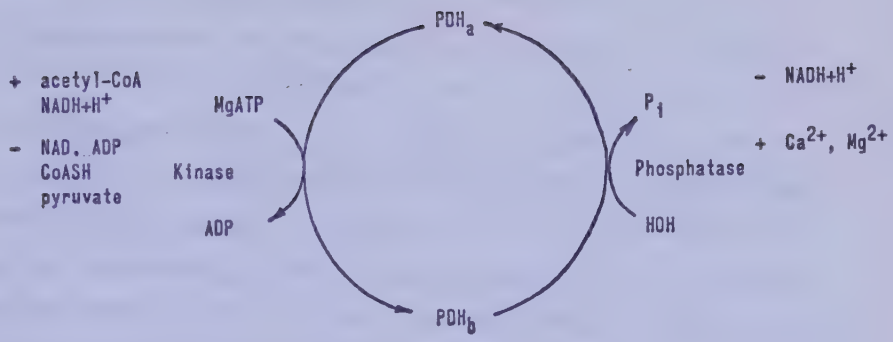

Abb. 3

Phosphorylierungs-, Dephosphorylierungscyclus des Pyruvatdehydrogenase Multienzymkomplexes

stellt sich die Frage, ob die Pyruvatoxidationsrate mit dem prozentualen Anteil PDHa ebenfalls schwankt oder ob die verbleibende Aktivität ausreicht, das angebotene Substrat unverändert zu oxidieren. In diesem Fall würde der aktuelle Aktivitätsgrad der PDH keinerlei Einfluß auf die Oxidationsrate nehmen.
Eine weitere Frage ist, ob Pyruvat bei diabetischer Stoffwechsellage und zusätzlicher Glucocorticoidvorbehandlung unter Carboxylierung in den Citratcyclus einfließen kann. Dies sollte anhand geänderter CO_2-Entstehung aus 3-^{14}C-Pyruvat nachweisbar sein.

Drastische Änderungen der Pyruvat-Oxidation sollte man bei Muskelarbeit erwarten. Bei Perfusionsversuchen an Normaltieren konnte gezeigt werden, daß der zeitliche Ablauf der Pyruvatoxidation unmittelbar nach Arbeitsbeginn durch Reizen des N.ischiadicus einen bestimmten Verlauf nimmt (9). Die Frage ist nun, wie sich die genannten Vorbehandlungen auf die Pyruvat-Oxidationsrate unter diesen Bedingungen ändert.
In der vorliegenden Arbeit wurden Perfusionsversuche an streptozotocin-diabetischen Tieren mit 1-^{14}C-Pyruvat und 3-^{14}C-Pyruvat durchgeführt. Gegenübergestellt wurden Versuche am ruhenden Muskel und unter Arbeit jeweils an gefütterten und gehungerten Tieren sowie nach Betamethasonvorbehandlung.

2.

Material und Methoden

2.1

Vorbehandlung der Versuchstiere

Alle Versuche wurden an männlichen Albinoratten durchgeführt (H:Wistar II, Tierversuchsanlage Düsseldorf). Die Tiere hatten ein Körpergewicht von 150 - 200 g.

Durch intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (100 mg/kg Körpergewicht, 0,1 mol Citrat/l, pH 4,5) 6 Tage vor dem Versuch wurde ein Diabetes induziert. Blutzuckermessungen erfolgten nach der semiquantitativen Teststäbchenmethode mit Dextrostix (Fa. Miles, Sparte Ames, Frankfurt). Die Tiere hatten am Versuchstag Blutzuckerkonzentrationen von über 400 mg/100 ml.

Betamethason (5 mg/kg Körpergewicht) wurde 3,5 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal verabreicht.

Die Tiere hatten entweder freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter, Fa. Höveler, Langenfeld) und Wasser oder hungerten 24 h vor Versuchsbeginn.

2.2

Methodik der Perfusion

2.2.1

Perfusionsmedium

Als Perfusionspuffer wurde Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer unter Zusatz von Albumin aus Rinderserum (Fraktion V, Fa. Miles, Frankfurt oder Fa. Biomol, Ilvesheim), Pyruvat (Fa. Merck, Darmstadt) und Heparin (Liquemin, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach) eingesetzt. 15 min vor Versuchsbeginn sowie während der gesamten Versuchsdauer wurde das Perfusionsmedium mit Carbogen (Linde-Gasgemisch, 95% O_2, 5% CO_2) begast.
Tabelle 1 gibt die Zusammensetzung des benutzten semisynthetischen Perfusionsmedium an.

Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer pH 7,3

Bestandteil	Konzentration bezogen auf 1000 ml
Na^+	5,94 mmol
K^+	143,53 mmol
Ca^{2+}	2,54 mmol
Mg^{2+}	1,05 mmol
Cl^-	130,70 mmol
$H_2PO_4^-$	1,19 mmol
HCO_3^-	24,76 mmol

15 minütiges Begasen mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2)

Rinderserumalbumin	60 g
Na-Pyruvat	0,15 mmol

Tab. 1

Zusammensetzung des Perfusionsmediums

2.2.2

Perfusionsapparatur

Für die Versuche wurde die hierfür übliche Apparatur benutzt (Abb. 4, (10)). Sie bestand aus einem Vorratsgefäß (V), in welches das Perfusionsmedium eingefüllt wurde. Das Medium wurde in einem Oxygenator (Ox) mit wasserdampfgesättigtem Carbogen begast. Durch einen Warmwasserkreislauf wurde das Perfusionsmedium auf 37 C erwärmt. Eine Rollerpumpe (Pu) beförderte das Medium über einen Filter (F) an einer Meßzelle (MZ1) mit Elektroden zur kontinuierlichen pH- und pO_2-Messung vorbei in ein Überlaufgefäß (Ü). Aus diesem konnte das Medium wieder in das Vorratsgefäß zurückfließen. Ein zweiter Ablauf mit Hahn führte über einen PVC-Schlauch zur Aortenkanüle (AK). Das nach Durchfluß durch das Hinterkörperpräparat über eine Venenkanüle (VK) fließende Perfusat wurde, nachdem es eine zweite Meßzelle passiert hatte, in einem Fraktionskollektor (FK) aufgefangen. Radioaktive Substanzen wurden über eine Infusionspumpe (PE) in den zur Aortenkanüle führenden Schlauch über einen Dreiwegehahn (DH) kontinuierlich zugegeben (s. Abb. 4).

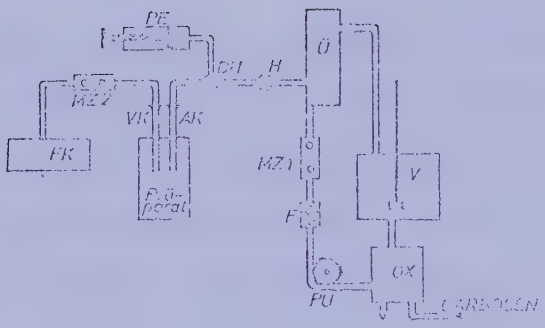

Abb. 4

Schematisierte Darstellung der verwendeten Perfusionsapparatur

2.2.3

Organpräparation

Narkotisiert wurden die Versuchstiere durch i.p.-Injektion von 20 mg Hexobarbital/100 g Körpergewicht (Evipan-Natrium, Fa. Bayer AG, Leverkusen). Gleichzeitig erhielten die Tiere 1000 USP-E Heparin (entsprechend 0,2 ml Liquemin, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach).

Die Präparation des Hinterkörpers erfolgte mit geringfügigen Modifikationen nach bereits beschriebenen Methoden (10):

Durch Längsschnitt vom Processus xiphoideus des Brustbeines bis zur Symphyse wurde der Bauchraum eröffnet. Nach Unterbinden der zuführenden und ableitenden Gefäße sowie der Ureteren wurden Hoden, Nebenhoden, Samenblasen, Samenstränge, Harnblase sowie Bauchorgane abgesetzt. Nachdem nur noch die Leber und die Nieren in situ verblieben waren, wurden die vasa epigastrica inf. unterbunden, die vasa iliolumbalia doppelt ligiert und zwischen den Ligaturen durchtrennt. Danach wurde die Aorta und die vena cava freipräpariert und die Vertebralgefäße abgebunden. Da nur eine Hälfte des Hinterkörpers perfundiert werden sollte, wurden die Gefäßstämme der anderen Seite abgebunden; außerdem wurde der Schwanz abgeklemmt. Um die Aorta und vena cava wurde dann je eine craniale Schlinge unterhalb des Nierenpols gelegt. Zur späteren Fixierung der Kanülen wurden außerdem jeweils caudal Schlingen um Aorta und vena cava angebracht. Durch Zuziehen der cranialen Schlingen wurde der Blutzufluß zum und vom Hinterbein beendet und

eine kurze Hypoxiezeit begann, die mit laufender Perfusion nach Einbringen der Kanülen endete. Nach Sistieren des Blutflusses wurde zunächst die Aorta caudal der Ligatur kanüliert (Braunüle, 0,5, Fa. Braun, Melsungen) und die Kanülenspitze bis kurz vor die Bifurcatio aortae vorgeschoben. Die mit der caudalen Aortenumschlingung fixierte Kanüle wurde an das Perfusionssystem angeschlossen. Nach Auffüllen der vena cava wurde diese mit einer Braunüle 1,0 kanüliert und die Spitze ebenfalls bis kurz vor die Bifurkation vorgeschoben und fixiert. Eine Schlauchverbindung führte von der kanülierten Vene zum Fraktionssammler. Der Rattenkörper wurde mit Beginn der Perfusion am unteren Nierenpol mit einem am Operationstisch befestigten Stahlstab abgequetscht. Hierdurch sollten Verluste von Perfusionsmedium über Gefäßanastomosen verhindert werden.
Bei den Versuchen, bei denen der N.ischiadicus gereizt wurde, wurde vor der Organpräparation der N.ischiadicus dargestellt und an Elektroden des Reizgerätes angeschlossen.

2.2.4
Infusion von radioaktiven Tracern

Über eine Infusionspumpe wurde dem Perfusionsmedium kurz vor Eintritt in das Organpräparat über einen Dreiwegehahn radioaktives Pyruvat zugesetzt. Eingesetzt wurde entweder 1-^{14}C-oder 3-^{14}C-Pyruvat (Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig) gelöst in 1 ml

des Perfusionsmediums (8 . 10^6 dpm/ml).
Innerhalb von 10 min wurde 1 ml Lösung infundiert (= 800 000 dpm/min).
Die arterio-venöse Differenz zeigte, daß 98% der infundierten Radioaktivität wieder eluiert wurden.

2.2.5
Verlauf der Perfusion

Die Organpräparation dauerte durchschnittlich 25 min. Darauf folgte eine Hypoxiezeit von 3 - 4 min. 15 min wurde mit Puffer äquilibriert, danach 10 min radioaktives Pyruvat mit Hilfe einer Infusionspumpe dem Perfusionsmedium zugegeben. Stimulation des N. ischiadicus (5 V, 0,5 ms, 5 Hz) erfolgte 6 min nach Beginn der Zugabe radioaktiven Pyruvats und wurde bis zum Versuchsende durchgeführt. Die Auswaschphase wurde über einen Zeitraum von 5 min nach Beenden der Infusion des Tracers verfolgt. Eine Übersicht gibt Abb. 5.

2.3
Messungen

2.3.1
Messungen der Gesamt-^{14}C-Aktivität

Das Perfusat wurde in 6 sec Abstand (ca. 2 ml, abhängig von der Flußrate) fraktioniert. Bei Versuchen unter Stimulation wurden

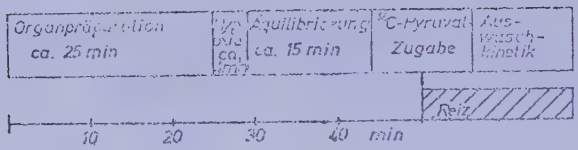

Abb. 5

Schema des Perfusionsverlaufs

Abb. 6

Darstellung der für die $^{14}CO_2$-Bestimmung verwendeten Apparatur

unmittelbar nach Reizbeginn 40 Fraktionen in 3 sec Intervallen aufgefangen. Zur Messung der Gesamt-^{14}C-Aktivität wurden 0,1 ml Perfusat entnommen, mit 10 ml Quickszint R212 (Fa. Zinsser, Frankfurt) versetzt, geschüttelt und im Liquid-Scintillation-Counter vermessen.

2.3.2

Messung von $^{14}CO_2$

Für die Austreibung und Bestimmung des radioaktiven Kohlendioxids wurde ein Gasentwicklungs- und -absorptionsgefäß eingesetzt, das in Abb. 6 dargestellt ist.

In ein 20 ml Szintillationsgefäß (A) wurde 1 ml Hydroxide of Hyamine (Fa. Packard, Frankfurt) pipettiert. Ein kleineres leeres Szintillationsgefäß (D) mit seitlichen Bohrungen (E) im oberen Drittel wurde in das größere Gefäß eingelassen und mit einem enganliegenden O-Flachring gehalten (C).

Der zu Gefäß A passende, durchbohrte Verschluß (B) wurde aufgeschraubt. Durch die Öffnung des kleineren Gefäßes wurden 0,5 ml Perfusat, dazu 1 ml 2 mol Citronensäure/l gegeben und sofort mit Hilfe der zugehörigen Verschlußkappe verschlossen. Durch die Löcher im kleinen Szintilationsgefäß konnte das sich entwickelnde CO_2 entweichen und wurde durch die Base im großen Gefäß absorbiert. Zur vollständigen Gasentwicklung und Absorption wurden die Gefäße danach 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Danach wurden die kleinen Gefäße aus den großen entnommen. Die Base im großen Gefäß wurde mit 10 ml Permafluor V (Fa. Packard, Frankfurt) versetzt und vermessen.
Einen typischen $^{14}CO_2$-Kurvenverlauf zeigt die Abbildung 7. Aus dieser Kurve können sowohl die Halbwertszeiten für die Auswaschkinetik als auch der zeitliche Verlauf der Pyruvatoxydation am PDH - Multienzymkomplex über ein Verfolgen des Plateaus bestimmt werden.

2.4
Grenzen für die Halbwertszeiten der Auswaschkinetiken

Für den Bereich der zu erwartenden Halbwertszeiten bei den Auswaschkinetiken wurden die in (7) ermittelten Halbwertszeiten für die Auswaschkinetiken zugrunde gelegt. Für U-^{3}H-Inulin, dessen Verteilungsraum nur extracellulär ist, waren Werte von 14 $\pm$ 1 sec, für $^{3}H_2O$, das frei intra- und extracellulär diffundiert, Werte von 64,5 $\pm$ 1 gefunden worden. Derart bestimmte Halbwertszeiten von $^{14}CO_2$ können nach (11) als Maß für die Oxidationsrate von Pyruvat gelten.

2.5
Ermittlung der Halbwertszeit

Die Halbwertszeiten ($t_{0,5}$ sec) aus den $^{14}CO_2$ - Auschwaschkurven wurden arithmetisch und graphisch ermittelt.

Da der erste Teil der Auswaschkinetik annähernd linear verläuft, kann hier über die Berechung einer linearen Regression der Wert für die Halbwertszeit arithmetisch ermittelt werden. Für die Berechnung der Halbwertszeit über eine exponentielle Regression unter Berücksichtigung des weiteren Kurvenverlaufs gilt prinzipiell ein gleiches Vorgehen wie für die Berechnung der linearen Regression.

Die Koeffizienten für die zugrunde liegende Geradengleichung

$$y = ax + b$$

lassen sich mit den Formeln

$$a = \frac{\frac{\sum x_i \sum y_i}{n} - \sum x_i \cdot y_i}{\frac{(\sum x_i)^2}{n} - \sum x_i^2}$$

und

$$b = \overline{y} - a\overline{x}$$

bestimmen.

Dabei ist

$$\overline{y} = \frac{\sum y_i}{n}$$

und

$$\overline{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Der Schnittpunkt der ermittelten Geraden mit der x-Achse (x_2, Abb. 7) ergibt sich aus

$$y = 0$$

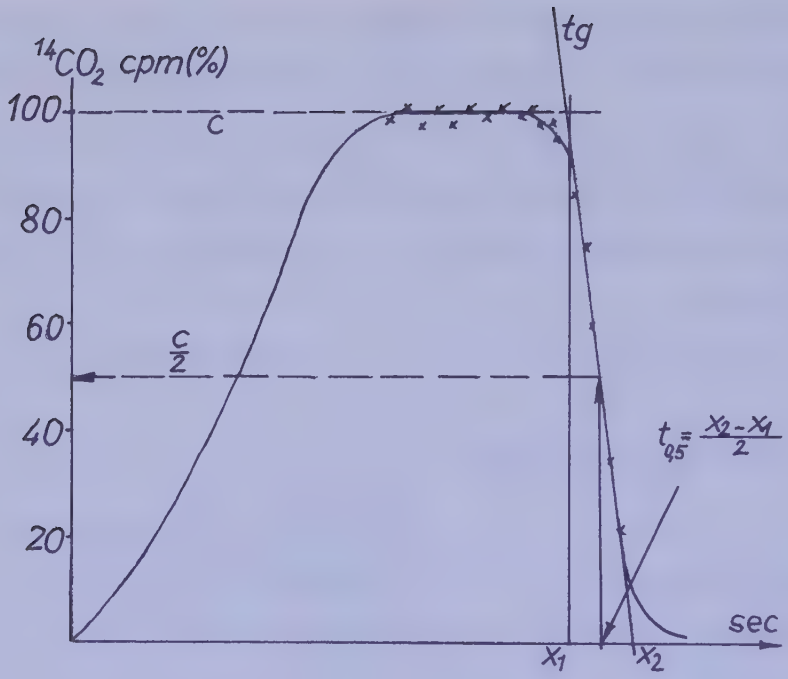

Abb. 7

Schema zur graphischen Ermittlung der Halbwertszeit der off-Kinetik ($t_{0,5}$)

$$0 = ax + b$$

$$x = \frac{-b}{a}$$

Das Plateau im Perfusionsverlauf wird als Mittelwert aus den einzelnen Meßwerten bestimmt. Der x-Wert des Schnittpunktes des Plateaus mit der errechneten Geraden (x_1, Abb. 7) errechnet sich über

$$y = c \qquad \text{(Plateau)}$$

$$y = ax + b \qquad \text{(Regressionsgerade)}$$

$$c = ax + b$$

$$x = \frac{c-b}{a} \qquad \text{(Schnittpunkt).}$$

Bei der graphischen Ermittlung der Halbwertszeit wird zunächst durch die Punkte des Plateaus eine gemittelte Gerade gelegt (c, Abb. 7). Die Punkte des ersten, angenähert linearen Teils der Auschwaschkinetik werden ebenfalls als Gerade gemittelt (tg, Abb. 7). Man erhält einen Schnittpunkt mit der x-Achse (x_2, Abb 7). Vom Schnittpunkt der Geraden mit der Geraden des Plateaus wird das Lot auf die x-Achse gefällt und man erhält den Schnittpunkt x_1 (Abb. 7). Da die x-Achse als Zeitachse dimensioniert ist, erhält man die Halbwertszeit über

$$t_{0,5} = \frac{x_2 - x_1}{2}$$

2 6 Versuchsplanung

Folgende Perfusionsversuche wurden an streptozotocin diabetischen Ratten durchgeführt:

markierte Substrate:

- 1-^{14}C-Pyruvat
- 3-^{14}C-Pyruvat

Versuchsparameter:

- Ruhe
- Arbeit (Reiz des N. ischiadicus)

Vorbehandlung der Tiere:

- gefüttert
- Nahrungsentzug 24 h vor Perfusionsbeginn, Wasser ad libitum
- gefüttert, 3-4 h vor Perfusionsbeginn Betamethason (5 mg/kg KG)
- Nahrungsentzug 24 Stunden vor Perfusionsbeginn, Wasser ad libitum, 3-4 h vor Perfusionsbeginn Betamethason (5 mg/kg KG)

3.

Ergebnisse

3.1

Durchflußgeschwindigkeiten

Von den Perfusionsversuchen wurden nur die ausgewertet, bei denen die Durchflußrate über 12 ml/min betrug, um durch Organschädigungen hervorgerufene Fehler zu vermeiden. So wurden z.B. bei Präparaten, deren Durchflußraten unterhalb dieses Wertes lagen, Ödembildungen beobachtet. Die folgende Aufstellung gibt die Mittelwerte der Flußraten aus mindestens zwei Perfusionsversuchen der unterschiedlich behandelten Tiere.

	1-^{14}C-Pyruvat	3-^{14}C-Pyruvat
a) in Ruhe		
gefütterte Tiere	17 ml/min	13 ml/min
Hungertiere	16 ml/min	14 ml/min
mit Betamethason vorbehandelte Tiere		
gefütterte Tiere	18 ml/min	15 ml/min
Hungertiere	15 ml/min	15 ml/min
b) unter Arbeit		
gefütterte Tiere	20 ml/min	19 ml/min
Hungertiere	17 ml/min	18 ml/min
mit Betamethason vorbehandelte Tiere		
gefütterte Tiere	18 ml/min	17 ml/min
Hungertiere	17 ml/min	15 ml/min

Tabelle 3

Durchschnittswerte der Flußraten des Perfusionsmediums bei streptozotocin-diabetischen Tieren

Aus Tabelle 3 geht hervor,daß zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen kein wesentlicher Unterschied bei den Durchflußgeschwindigkeiten auftrat; der Mittelwert beträgt 16,5 $\pm$ 1,9 sec.

3.2

Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus ^{14}C-Pyruvat

Die ermittelten Halbwertszeiten der Auswaschkinetik von $^{14}CO_2$ aus ^{14}C-markiertem Pyruvat bei mit Streptocotozin vorbehandelten Tieren gibt Tabelle 4 an.

	1-^{14}C-Pyruvat	3-^{14}C-Pyruvat
a) in Ruhe		
gefütterte Tiere	32 ± 3	39 ± 4
Hungertiere	34 ± 4	30 ± 4
mit Betamethason vorbehandelte Tiere		
gefütterte Tiere	44 ± 2	30 ± 4
Hungertiere	40 ± 1	29 ± 2
b) unter Arbeit		
gefütterte Tiere	38 ± 2	40 ± 2
Hungertiere	39 ± 3	60 ± 5
mit Betamethason vorbehandelte Tiere		
gefütterte Tiere	32 ± 2	31 ± 2
gehungerte Tiere	48 ± 4	27 ± 4

Tabelle 4

Halbwertszeiten der $^{14}CO_2$-Auswaschkinetik ($t_{0,5}$ sec) aus ^{14}C-Pyruvat bei streptozotocin-diabetischen Tieren (n=2, 0,15 mmol Pyruvat/l)

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, sind die Halbwertszeiten bei

allen Versuchsgruppen gegenüber den Halbwertszeiten der gefütterten Normaltiere ($t_{0,5}$=21,6 sec) erhöht.

3.3

Verlaufskurven der $^{14}CO_2$-Entwicklung aus ^{14}C-Pyruvat, Tiere unter Arbeit

Abb. 8 zeigt die Verlaufskurven der $^{14}CO_2$ Entstehung aus ^{14}C-Pyruvat nach Arbeitsbeginn durch Reizen des N. ischiadicus bei streptozotocin-diabetischen Tieren. Die Kurven sind auf 100% für die maximale Decarboxylierungsrate normiert.

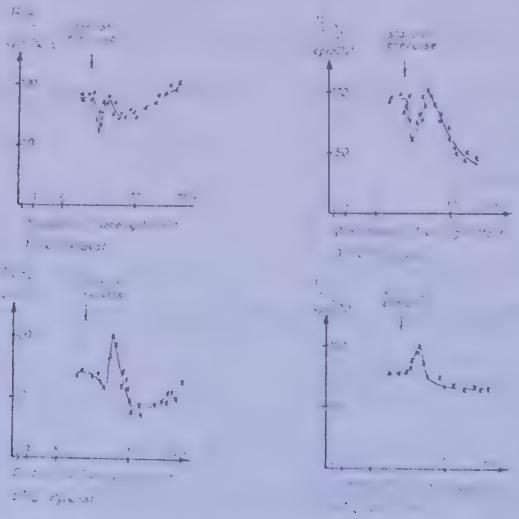

Abb. 8

Darstellung der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus ^{14}C-Pyruvat unmittelbar nach Beginn der Stimulation des N. ischiadicus (n=2)

Abbildung 9 zeigt die Verlaufskurven der $^{14}CO_2$ Entstehung aus ^{14}C-Pyruvat bei mit Betamethason vorbehandelten streptozotocin-diabetischen Tieren nach Arbeitsbeginn durch Reizen des N. ischiadicus. Die $^{14}CO_2$ Entstehungsrate ist auf 100% für den gefundenen Maximalwert normiert.

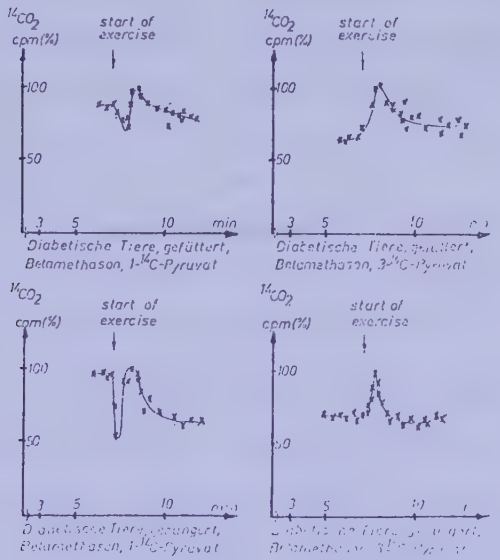

Abb.9

Darstellung der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus ^{14}C-Pyruvat bei vorbehandelten Tieren unmittelbar nach Beginn der Stimulation des N. ischiadicus

Wie aus den Verlaufskurven der $^{14}CO_2$-Entwicklung in den Abbildungen 8 und 9 zu ersehen ist, tritt bei den diabetischen Tieren nach Reizbeginn bei Einsatz von 1-^{14}C-Pyruvat eine stärkere Verminderung der $^{14}CO_2$-Entwicklung auf als bei Normaltieren. Beim Einsatz von 3-^{14}C-Pyruvat verlaufen die Kurven ähnlich den Kurven der Normaltiere. Allerdings ist bei den diabetischen Tieren der Anstieg nach Reizbeginn erheblich geringer. Nur die unbehandelten gefütterten diabetischen Tiere zeigen einen deutlichen Einbruch nach Reizbeginn.

4.

Diskussion

4.1

Vorteile des Modells des perfundierten Hinterkörpers

Stoffwechseluntersuchungen am Skelettmuskel wurden an verschiedenen Modellen mit unterschiedlichen Muskeltypen durchgeführt. Das Modell des isoliert perfundierten Rattenhinterkörpers wird für Stoffwechseluntersuchungen schon seit Jahren angewandt (12). Es weist, vor allem im Gegensatz zu in vitro Untersuchungen, eine Reihe von Vorteilen auf. Das Gefäßsystem des Muskelpräparates bleibt erhalten, so daß bei der Perfusion soweit wie möglich physiologische Diffusionsbedingungen bestehen. Der Rattenhinterkörper wird über die Bauchaorta perfundiert und das Perfusat aus der vena cava fraktioniert aufgefangen. Die Parameter des Perfusionsmediums (pH, pO_2, osmotischer Druck, Elektrolyte) entsprechen den physiologischen Werten. Die Präparationsmethodik bietet weiterhin den Vorteil, daß der Gehalt an energiereichen Phosphaten im m. gastrocnemius konstant bleibt und sich im physiologischen Bereich bewegt (11). Bei der Hinterkörperperfusion hat das nicht-muskuläre Gewebe (Fett, Knochen, Haut) nur einen vernachlässigbaren stoffwechselaktiven Anteil (10-15%), die Muskelmasse des Gesamtkörpers wird bei diesem Präparat zu 40% erfaßt.

4.2

Validität der verwendeten Methodik

4.2.1

Off-Kinetik

Die Methode der Pyruvatdehydrogenase-Aktivitätsmessung durch Verfolgen der off-Kinetik von $^{14}CO_2$, freigesetzt aus 1-^{14}C-Pyruvat, wurde im Detail von Scholz et al. (11) für die perfundierte Rattenleber beschrieben.

Einige charakteristische Größen für das System des perfundierten Hinterkörpers zeigt Tab. 5 (nach 7). Die untere Grenze der zu erwartenden Halbwertszeit wird durch die off-Kinetik von Inulin gegeben, das sich gleichmäßig im extracellulären Raum verteilt; die obere Grenze wird durch Perfusion mit $^{3}H_2O$ gemessen, das gleichmäßig über Extra- und Intracellulärräume diffundiert.

Substrat	off-Kinetik ($t_{0,5}$ sec)
^{3}H-Inulin	14
$^{3}H_2O$	63
1-^{14}C-Pyruvat	21
bei Ggw. von 2,4-Dinitrophenol	17
bei Ggw. von Acetoacetat	38

Tab. 5

Halbwertszeiten der off-Kinetik ($t_{0,5}$ sec) unterschiedlicher Substrate und von $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat bei Gegenwart von 2,4-Dinitrophenol und Acetoacetat

Der Einfluß von 2,4-Dinitrophenol als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung (Aktivierung der PDH durch Verschieben des NADH/NAD-Verhältnisses zugunsten von NAD, Vermindern des Gehalts an ATP) sowie Acetoacetat (Inhibitor der PDH über Acetyl-CoA (1, 13)) zeigen die zu erwartenden Grenzen für die Pyruvatoxidation. Eine Fixierung des freigesetzten $^{14}CO_2$ ist zumindest am ruhenden Skelettmuskel nicht in nenneswertem Ausmaß zu erwarten (Fehlen der Pyruvatcarboxylase), so daß die aus der off-Kinetik zu gewinnenden Daten mit der Pyruvatoxidationsrate direkt korrelieren.

4.2.2

Messungen am Plateau

Neben dem Ansatz, die Pyruvatoxidationsrate anhand der Auswaschkinetik von Produkten nach Absetzen radioaktiv markierter Substrate zu verfolgen, hat man die Möglichkeit, Änderungen der Oxidationsrate von Pyruvat während der Perfusion durch Verfolgen des entstehenden $^{14}CO_2$ in der Plateauphase zu messen (siehe 2.3.2). Wurden durch eine Äquilibrierungsphase konstante Bedingungen im perfundierten Muskel geschaffen, lassen sich durch Ändern von Versuchsparametern bewirkte Übergänge zu einem neuen steady-state anhand des Verlaufs der während gleichbleibender Infusion von Tracer geänderten freigesetzten Aktivitäten verfolgen. Derart konnte ein direkter Einfluß von Insulin auf die Pyruvatoxidation im Muskel aufgezeigt werden (14). Den Einfluß

von ß-Hydroxybutyrat auf die Pyruvatoxidation in der Leber verfolgten mit dieser Methodik Zwiebel et al. (15).

4.3
Diskussion der Ergebnisse

4.3.1
CO_2-Auswaschkinetiken

Aktivitätsmessungen der PDH am homogenisierten Skelettmuskel sind mit Hilfe der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus 1-^{14}C-Pyruvat von Hagg et al. (5) und anhand des optischen Tests mit Arylaminacetyltransferase von Hennig et al. (6) und Kraaz (8) durchgeführt worden. Tab. 6 zeigt vergleichend die gefundenen Werte.

	Hagg (5)	Hennig (6)	Kraaz (8)
gefüttert	22,0%	15,5%	28,1%
gehungert	14,0%	6,5%	16,4%
Diabetes	13,8%	9,3%	23,4%

Tab. 6
Der Effekt von Hunger und Diabetes auf den Aktivierungsgrad der PDH (PDHa in %PDHt), ermittelt in Muskelhomogenaten.

Diese Ergebnisse wurden von den genannten Autoren bereits hinreichend diskutiert (6,8). Von Interesse ist jedoch, ob die mit der Methodik der Auswaschkinetik erhaltenen Werte mit den aus in-vitro Aktivitätsmessungen erhaltenen vergleichbar sind. Dies kann mit Hilfe einer Korrelationsberechnung abgeschätzt werden. Eine

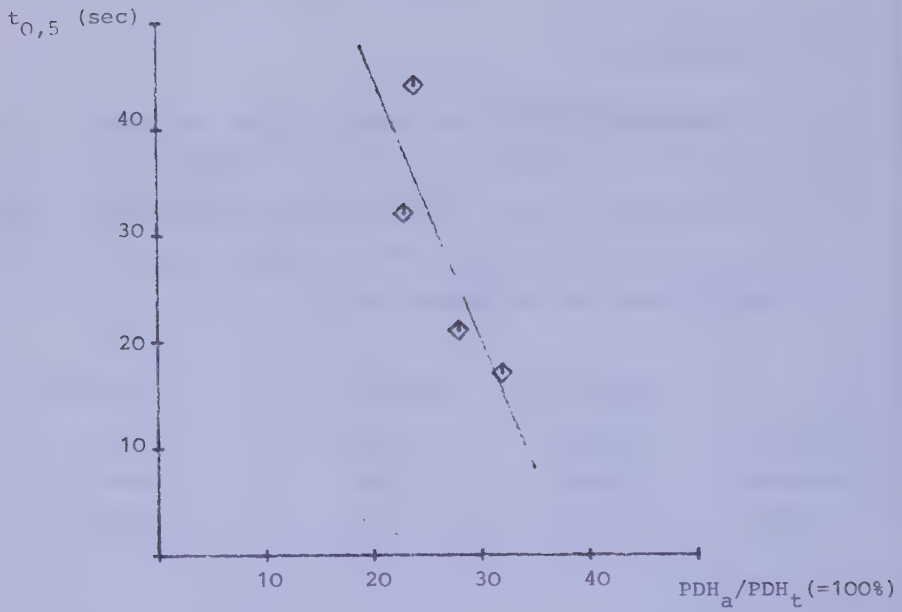

Abb. 10

Korrelationsdiagramm zwischen PDH_a/PDH_t (=100%) und $t_{0,5}$ der folgenden Versuchsgruppen:

	PDH_a/PDH_t (=100%)	$t_{0,5}$ (sec)
Normaltiere	28 (n=6)	21 (n=6)
zwangsgefüttert (unter Infusion von 2,4-DNP)	32 (n=3)	17 (n=2)
diabetisch, gefüttert	23 (n=5)	32 (n=2)
diabetisch, gefüttert nach Betamethason	24 (n=5)	44 (n=2)

r = 0,84 (unter Verwendung von Daten aus (7) und (8))

grafische Darstellung erfolgt in Abb. 10. Die Werte, die miteinander korreliert wurden, sind ebenfalls in Abb. 10 tabellarisch erfaßt. Die Berechnung einer linearen Korrelation erbringt einen Korrelationskoeffizienten r = 0,84. Dieser Wert zeigt, daß die Pyruvatoxidationsrate, ermittelt über die Auswaschkinetik, hochsignifikant mit der ermittelten aktuellen Pyruvatdehydrogenase-Aktivität korreliert.

Aus diesen Ergebnissen kann jedoch nicht abgeschätzt werden, ob eine verminderte Enzymaktivität eine geänderte Pyruvatoxidationsrate erklärt.

Ähnlich wie bei den in-vitro-Messungen der PDH-Aktivität konnte auch bei der Auswaschkinetik mit ^{14}C-Pyruvat kein Glucocorticoideffekt auf die Pyruvatoxydationsrate nachgewiesen werden (siehe Tab. 4).

Die für 3-^{14}C-Pyruvat ermittelten Halbwertszeiten der Auswaschkinetik deuten im Gegensatz zu 1-^{14}C-Pyruvat einen schnelleren Durchsatz für dieses Substrat an. Dieses Ergebnis könnte unseres Erachtens durch eine Carboxylierung von Pyruvat, das unter Umgehung der PDH über Oxalacetat in den Citratcyclus gelangt, erklärt werden (siehe 7). Nach Reizung des N. ischiadicus während der Perfusion wird dieser Effekt noch deutlicher.

4.3.2

Messungen von Änderungen der $^{14}CO_2$-Freisetzung aus ^{14}C-Pyruvat unmittelbar nach Arbeitsbeginn (Plateaumessungen)

Verfolgt man die $^{14}CO_2$ Entwicklung unmittelbar nach Arbeitsbeginn, im Versuchsmodell simuliert durch Reizen des N. ischiadicus, so erhält man charakteristische Verlaufskurven, die für das Normaltier in (7) erfaßt und diskutiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche Versuchsansatz verfolgt, um aufzuzeigen, welchen Einfluß ein induzierter Diabetes und eine Glucocorticoidvorbehandlung auf diese Verlaufskurven haben (Abb.8,9). Aus den Verlaufskurven kann man ersehen, daß Diabetes und Hunger auf die kurzfristige Regulation der Pyruvatoxidation unmittelbar nach Arbeitsbeginn unterschiedlich Einfluß nehmen. Die dem Normaltier am ehesten entsprechenden Kurven zeigen gefütterte, mit Betamethason vorbehandelte Tiere. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, weil bei dieser Versuchsgruppe in Ruhe kein signifikanter Einfluß der Glucocorticoidbehandlung auf die Auswaschkinetik des $^{14}CO_2$ aus 1-^{14}C-Pyruvat gefunden wurde, die aus 3-^{14}C-Pyruvat erhaltenen Halbwertszeiten jedoch die niedrigsten waren, die innerhalb der getesten Bedingungen auftraten. Dies kann als weiterer Hinweis für eine kurzfristige Regulation des Eintritts von Pyruvat in den Citratcyclus betrachtet werden und stützt die in (7) erhobenen Befunde.

5.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von diabetischer Stoffwechsellage und Glucocorticoidbehandlung auf die Pyruvatoxidationsrate am Modell des perfundierten Hinterkörpers der Ratte untersucht. Es wurde gefunden, daß

- die Pyruvatoxidationsrate mit Hilfe der Auswaschkinetik mit den Ergebnissen korrelieren, die bei in-vitro Messungen der Pyruvatdehydrogenase-Aktivität erhoben wurden. Diabetes und zusätzlich Hunger führen zu einem verminderten PDHa-Anteil der insgesamt aktivierbaren PDH und, wie hier gezeigt, zu einer verlängerten Halbwertszeit des aus 1-^{14}C-Pyruvat entstehenden $^{14}CO_2$.

- 1-^{14}C-Pyruvat und 3-^{14}C-Pyruvat verhalten sich unterschiedlich. Die mit 3-^{14}C-Pyruvat als Substrat erhaltenen Ergebnisse sind nicht ohne weiteres in das Schema der im Muskel stattfindenden Pyruvatoxidation einzuordnen, weil die Oxidationsrate dieses Substrates im Vergleich mit der von 1-^{14}C-Pyruvat erhöht gefunden wird. Als aufschlußreich für einen möglichen Mechanismus werden die Messungen angesehen, die die $^{14}CO_2$-Freisetzung aus den unterschiedlich markierten Substraten unmittelbar nach Arbeitsbeginn verfolgten. Aus den hier erhaltenen Verlaufskurven kann auf eine gegenüber dem Normaltier gestörte Kurzzeitregulation der Pyruvatoxidation geschlossen

werden, die durch Glucocorticoidgaben beeinflußt werden kann.

Es kann gefolgert werden, daß eine diabetische Stoffwechsellage nicht nur über die Bereitstellung von Pyruvat aus Glucose ihren Einfluß auf die Pyruvatoxidation nimmt, sondern daß hier ein Mechanismus gestört wird, der für die Regulation des Eintritts von Pyruvat in den Citratcyclus verantwortlich ist.

6.

Literaturverzeichnis

1. Hucho F

Der Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplex

Angew. Chem. 87 (1975) 614 - 624

2. Linn TC, Pelley JW, Pettit FH, Hucho F, Randall DD, Reed LJ

a-Keto-Acid Dehydrogenase Complexes XV.
Purification and Properties of the Component Enzymes of the Pyruvate Dehydrogenase Complex from Bovine Kidney and Heart

Arch. Biochem. Biophys. 148 (1972) 327 - 342

3. Whitehouse S, Cooper RH, Randle PJ

Mechanism of Activation of Pyruvate Dehydrogenase by Dichloroacetate and other Halogenated Compounds

Biochem. J. 141 (1974) 761 - 774

4. Buddecke E

Grundriß der Biochemie

deGruyter Verlag, Berlin

5. Hagg SA, Taylor SJ, Ruderman NB

Glucose Metabolism in Perfused Muscle
Pyruvate Dehydrogenase Activity in Starvation, Diabetes, and Exercise

Biochem. J. 158 (1976) 203 - 210

6. Hennig G, Löffler G, Wieland OH

Active and Inactive Forms of Pyruvate Dehydrogenase in Skeletal Muscle as related to the Metabolic and Functional State of the Muscle Cell

FEBS Lett. 59 (1975) 142 - 145

7. Nutz KD

Dissertation Universität Düsseldorf, med.Fak., 1984

8. Kraaz E

Diplomarbeit Biologie, Universität Düsseldorf, 1979

9. Förster MEC, Nutz KD, Schwenen M, Staib W

Time Course of the Oxidation of Pyruvate and Fatty Acids in Perfused Skeletal Muscle after Start of Work

Hoppe-Seyler s Z. Physiol. Chem. 361 (1980) 1280-1281

10. Ruderman NB, Houghton CRS, Hems R

Evaluation of the Isolated Perfused Rat Hindquarter for the Study of Muscle Metabolism

Biochem. J. 124 (1971) 639 - 651

11. Scholz R, Olson MS, Schwab AJ, Schwabe U, Noell C, Braun W

The Effect of Fatty Acids on the Regulation of Pyruvate Dehydrogenase in Perfused Rat Liver

Eur. J. Biochem. 86 (1978) 519 - 530

12. Schwenen M

Habilitationsschrift, med. Fak., Universität Düsseldorf, 1981

13. Denton M, Randle PJ, Bridges BJ, Cooper RH, Kerbey AL, Pask HT, Severson DL, Stansbie D, Whitehouse S

Regulation of Mammalian Pyruvate Dehydrogenase

Mol. Cell. Biochem. 9 (1975) 27 - 53

14. Schadewaldt P, Förster MEC, Staib W

Influence of insulin and calcium channel blockers on skeletal muscle pyruvate dehydrogenase in situ

Acta Endocrinol. 99 (1982) Suppl. 246, 115

15. Zwiebel FM, Schwabe U, Olson MS, Scholz R

Role of the Pyruvate Transporter in the Regulation of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex in Perfused Rat Liver

Biochem. 21 (1982) 346 - 353

7.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Staib danke ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung dieses Themas.
Bei Herrn Dr. rer.nat. M.E.C. Förster bedanke ich mich an dieser Stelle für die Einführung in die Thematik und die ständige Unterstützung bei den Versuchen und Messungen.
Außerdem danke ich Frau H. Ferrarini und den anderen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre im Labor.

8.

Lebenslauf

Angaben zur Person :	
Name	Dahlbüdding, Heinrich Arthur
Geburtstag und -ort	25. 4. 1953 in Witten/Ruhr
Eltern	Arthur Dahlbüdding sen., Konstrukteur Ingeburg Dahlbüdding, Hausfrau
Ehefrau	Ursula Dahlbüdding, geb. Wiedemann
Kinder	Kerstin und Heike Dahlbüdding
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung :	
1959 - 1964	Volksschule in Wengern/Ruhr
1964 - 1967	Volksschule in Schwelm
1967 - 1969	Gewerbeschule in Wuppertal, Fach: Metall
1969 - 1970	Fachoberschule in Wuppertal, 10. Klasse
1974 - 1976	Erzbischöfliches Friedrich-Spee-Kolleg in Neuß, Abschluß : Reifezeugnis
Berufsausbildung :	
1970 - 1974	Ausbildung zum Chemielaboranten und 5-monatige Tätigkeit als Chemielaborant
Studium :	
SS 1977 - SS 1983	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf (12 Semester)
Ärztliche Tätigkeit :	
Juni 1983 - Juni 1985	Chirurgischer Assistenzarzt im Marienhospital Schwelm (Chefarzt Dr. Hariri,Dr. Wagner)
ab Juli 1985	Chirurgischer Assistenzarzt im Verbands - krankenhaus Schwelm (Ltd. Arzt Dr. Schulz)
Dissertationsarbeit :	
1979 - 1983	Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf Direktor: Prof. Dr. Staib